

ラット脱灰骨の石灰化:組織化学的研究

著者	高橋 渉
号	655
発行年	1970
URL	http://hdl.handle.net/10097/18760

氏 名（本籍） たか はし わたる
高 橋 渉

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 博 第 6 5 5 号

学位授与年月日 昭 和 4 5 年 3 月 2 5 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

研究科専門課程 東北大学大学院医学 研究科
（博士課程）外科学系専攻

学位論文題目 Calcification of decalcified bone
grafts in rat:A histochemical study.
（ラット脱灰骨の石灰化：組織化学的研究）

（主 査）

論文審査委員 教授 榎 哲 夫 教授 森 富

教授 飯 野 三 郎

論 文 内 容 要 旨

I 研究目的

著者は EDTA (pH 7.4) で脱灰したラット長管骨スライスが同種腹壁内移植によつて、再石灰化することを利用して、その再石灰化過程における所謂酸性ムコ多糖類が演じる役割を中心に組織化学的な検索を行った。

II 材料及び実験方法

生後約2ヶ月のラットの脛骨近位端および大腿骨遠位端から約1 mm 厚の骨スライスを作り、これを5% EDTA 2 Na と5% EDTA 4 Na の等量混合液で Kossa 法陰性になるまで室温または冷蔵庫中で脱灰した。脱灰後、スライスに余分に含まれる EDTA を流水で十分に洗滌、蒸留水を頻回変えながら冷蔵庫中に保存し、実験に供した。下記の4群の前処理を施した骨スライスをエーテル麻酔下にホストラットの腹壁皮下組織内に移植した。前処理としては (I 群) 無処理, (II 群) 25 mM CaCl_2 , 37°C, 約2時間, (III 群) 1% GPC, 1% CTAB または 0.1% Toluidine blue O, いずれも 37°C, 2時間, (IV 群) III 群の前処理のものを更に 100 mM CaCl_2 , 37°C, 2時間処理した。1~5 週の後、移植片をとりだし、直ちにドライアイス、アセトンで冷却したヘキサンで凍結後、クリオスタットで 8 μ 厚の切片を作り、スライドガラスに貼り、室温で 10 分間乾燥させた。その後 10% フォルマリン及びカルノア液で各 10 分間固定し十分に脱脂して 70% アルコールに保存、組織化学的検索に用いた。対照は同じく4群の前処理をし、移植に供さなかつた骨片である。染色法としては、0.1% toluidine blue O, 1% alcian blue 8GX, colloidal iron (Mowry) PAS, Feulgen, methylgreen-pyronin, van Gieson, orcein, resorcin-crystalviolet (French), resorcin-fuchsin (Weigert), 鍍銀法 (石井-石井), von Kossa, alizarine red S, chloranilic acid, ninhydrin-Schiff, alkaline and acid phosphatase (Azo-dye 法) を用いた。

III 実験成績

1. 対照骨スライスの染色性：骨スライス作製過程で大量の酸性粘液性物質がスライスの軟骨基質から失われ、移植スライスには成熟軟骨細胞を除いて強い塩基好性は認められなかつた。失われた物質は組織化学的特徴からみて、コンドロイチン硫酸 A を多量に含む物質と考えられた。各種前処理によるスライスは、GPC, CTAB 処理での PAS 反応性の低下, toluidine blue 処理での phosphatase 活性の消失があるほかは著明な変化は認められなかつた。
2. 移植骨スライスの石灰化：石灰化の出現の時期は各実験毎に多少の遅速はあつても、各材料

の解剖学的各部位におけるCalcifiabilityの順序は一定であつた。その石灰化過程は無処理のI群では以下の如くであつた。即ち、基質に僅かにあつた塩基好性が消失し、直線的な細線維(PAS(+), 塩基好性(-), 膠原線維染色(+), Elasticastain(-), 銀好性(+))が露出、やがてこの細線維が迂曲して網目を造る。その線維網にかこまれて小さなKossa 法陽性の円形～楕円形の斑点(以下円形斑が現われる。この円形斑が石灰化であつて、その組織化学的特徴はPAS(++), 塩基好性(+), 弾性線維染色(+), 膠原線維染色(+), 銀好性(+), alkaline phosphatase(±~+)である。この小さな円形斑が集積し、全体として線維の走行に一致した杆状塊になる。II群では石灰化の出現までの時間の短縮と石灰化の程度の増強が特徴的であり、腱、筋肉および軟骨細胞の一部にも石灰化が認められた。その石灰化像は上記と多少異なり、腱では膠原線維上に、線維の直径より僅かに大きい円形顆粒(上記円形斑に当る)の沈着、筋では同様の円形顆粒の沈着が横紋を思わせる濃淡を示し、軟骨細胞の場合は成熟した、すなわちalkaline phosphatase活性の強いしかも強度の塩基好性を示す細胞にのみ石灰化がみられた。III群では石灰化を阻害するといわれているtoluidine blueのみならず、酸性ムコ多糖類に影響をもつといわれているCPC, CTABによつても石灰化が阻害された。かつ、I, II群にみられたような線維の露出も認められなかつた。この点は石灰化の機構を考える上で重要な所見であろう。またtoluidine blueによつて軟骨細胞の酵素活性が完全に消失していたが、この酵素活性と石灰化の関連は今後に残された問題である。なお、IV群では、III群で阻止されたCalcifiabilityの回復がみられた。

IV 結 語

1) 石灰化に関する酸性ムコ多糖類の関与としては、まず、軟骨基質についてみるとコンドロイチン硫酸Aを主成分とする物質の大量流失が起る。ついで、骨基質と同様にやがて、石灰化する部位に一致して線維が出現し、石灰化の足場を作るものと考えられる。しかも、流失した物質は最近Schubertらにより指摘されている石灰化阻害物質とよく一致するようと思われる。一方、軟骨細胞では酸性ムコ多糖類の存在を示す塩基好性が強く認められ、同時に石灰化が認められた。したがつて、酸性ムコ多糖類の石灰化に関する意義は、或る種のものはこれを阻害し、ある種のものはこれに参与している可能性のあることが推察される。2) III群で使用した試薬は、酸性ムコ多糖類の流失を阻害するといわれているが、移植片スライスには、その作製過程ですでに酸性ムコ多糖類が流失しているにもかかわらず、石灰化が阻害された。これらの処理は、線維の露出を阻害することがわかつたが、CPC, CTAB, toluidineの作用機序にはなお解明できない点が残されている。3) 石灰化は膠原線維のみならず、筋や軟骨細胞にもみられたが、顕微鏡的にはそれぞれsite-specificな現象であることが認められた。したがつて、これまでいわれているように、collagenやelastoidを足場とした石灰化という考えのみではそのような部位特異性を説明できずこれら石灰化組織に共通した物質の存在も考慮すべきであろう。

審 査 結 果 の 要 旨

生体内における石灰化の機転に関して、従来より、多くの仮説がなされてきたが、今日なお定説をみるに至らない。特に、問題は石灰化機転における細胞間質の位置についてであろう。細胞間質は組織学的に、1) 酸性ムコ多糖を中心とする線維間質 2) 膠原線維を中心とする線維成分、より構成される。著者は、ラットの脱灰長管骨片の移植による再石灰化を利用して、この問題について組織化学的検索を試み、新知見と問題提起を行つている。

まず、酸性ムコ多糖の参与については、従来その種類を考慮することなく一括して論じられていた。ために全く相反する説がなされていたほどであつたが、ここに少なくともコンドロイチン硫酸-Aを主成分とする物質と、他のいわゆる酸性ムコ多糖とでは参与の仕方が全く異なるであろうことを指摘している。また、他のいわゆる酸性ムコ多糖については、その石灰化能がトリジンブルーによつて消失することは古くから知られているが、酸性ムコ多糖と特異的に反応するといわれるCPC, CTABによつても、また、石灰化能が消失することが示された。このことは、石灰化機転における酸性ムコ多糖の重要性をさらに強調するものであるが、次に述べる線維との関係において論じられるべきであるとしている。次に、膠原線維については、その重要性を再評価しつつも膠原線維のみを足場とした石灰化の理論には疑問をなげかけている。すなわち、筋細胞や軟骨細胞も石灰化しうることをみ、このことから石灰化の足場として石灰化組織に共通した物質の存在を考慮すべきであろうことを指摘している。

以上は従来からなされてきた諸説に、新しい評価の規準をあたえ、かつ今後への問題提起としての意義が大きい。よつて、本論文は学位を授与するに値するものと認める。